

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/005719

International filing date: 28 March 2005 (28.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2004-095263  
Filing date: 29 March 2004 (29.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 20 May 2005 (20.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2 0 0 4 年 3 月 2 9 日

出 願 番 号  
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 0 9 5 2 6 3

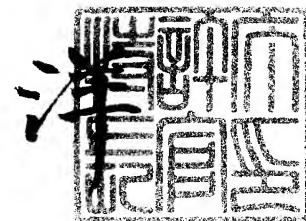
パリ条約による外国への出願  
に用いる優先権の主張の基礎  
となる出願の国コードと出願  
番号  
J P 2 0 0 4 - 0 9 5 2 6 3  
The country code and number  
of your priority application,  
to be used for filing abroad  
under the Paris Convention, is

出 願 人  
Applicant(s): 三井化学株式会社

2 0 0 5 年 4 月 2 7 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



【書類名】	特許願
【整理番号】	P0002976
【提出日】	平成16年 3月 29日
【あて先】	特許庁長官 殿
【国際特許分類】	C12P 7/00
【発明者】	
【住所又は居所】	千葉県茂原市東郷 1 1 4 4 三井化学株式会社内
【氏名】	松本 和也
【発明者】	
【住所又は居所】	千葉県茂原市東郷 1 1 4 4 三井化学株式会社内
【氏名】	数野 康
【発明者】	
【住所又は居所】	千葉県茂原市東郷 1 1 4 4 三井化学株式会社内
【氏名】	東村 紀一
【発明者】	
【住所又は居所】	徳島県徳島市南常三島町 2 丁目 1 番地 徳島大学内
【氏名】	大島 敏久
【発明者】	
【住所又は居所】	徳島県徳島市南常三島町 2 丁目 1 番地 徳島大学内
【氏名】	櫻庭 春彦
【特許出願人】	
【識別番号】	000005887
【氏名又は名称】	三井化学株式会社
【代表者】	中西 宏幸
【手数料の表示】	
【予納台帳番号】	005278
【納付金額】	21,000円
【提出物件の目録】	
【物件名】	特許請求の範囲 1
【物件名】	明細書 1
【物件名】	図面 1
【物件名】	要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

炭素数が 2 から 4 の脂肪族アルデヒド化合物に対し、アセトアルデヒドを 1 分子アルドール縮合することで、炭素数が 2 増加したアルデヒド化合物を製造する方法、もしくはアルドール縮合により得られた該アルデヒド化合物に対し、さらにアセトアルデヒドを 1 分子アルドール縮合することで、炭素数が 4 増加したアルデヒド化合物を製造する方法であって、該アルドール縮合を下記の (1) または (2) の特徴を有する D-2-デオキシリボース-5-リン酸アルドラーゼ、または該酵素を含む細胞またはその処理物の存在下に行うことを特徴とする方法。

(1) 少なくとも配列番号 1 に示されたアミノ酸配列を有する、

(2) 少なくとも配列番号 1 記載のアミノ酸配列の、1 ないし数個のアミノ酸が欠失、または他のアミノ酸残基に置換され、或いは他のアミノ酸残基が挿入されたアミノ酸配列を有し、かつ炭素数が 2 から 4 の脂肪族アルデヒド化合物に対し、アセトアルデヒドを 1 分子アルドール縮合する、もしくはさらに 2 分子目のアセトアルデヒドをアルドール縮合する活性を有する。

【請求項 2】

炭素数が 2 から 4 の脂肪族アルデヒド化合物に対し、アセトアルデヒドを 1 分子アルドール縮合することで、炭素数が 2 増加したアルデヒド化合物を製造する方法、もしくはアルドール縮合により得られた該アルデヒド化合物に対し、さらにアセトアルデヒドを 1 分子アルドール縮合することで、炭素数が 4 増加したアルデヒド化合物を製造する方法であって、該アルドール縮合を下記の (1) または (2) の特徴を有する D-2-デオキシリボース-5-リン酸アルドラーゼ、または該酵素を含む細胞またはその処理物の存在下に行うことを特徴とする方法。

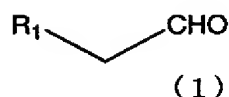
(1) 少なくとも配列番号 2 に示されたアミノ酸配列を有する、

(2) 少なくとも配列番号 2 記載のアミノ酸配列の、1 ないし数個のアミノ酸が欠失、または他のアミノ酸残基に置換され、或いは他のアミノ酸残基が挿入されたアミノ酸配列を有し、かつ炭素数が 2 から 4 の脂肪族アルデヒド化合物に対し、アセトアルデヒドを 1 分子アルドール縮合する、もしくはさらに 2 分子目のアセトアルデヒドをアルドール縮合する活性を有する。

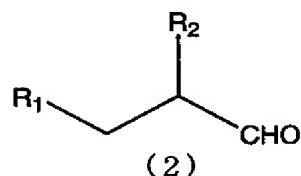
【請求項 3】

一般式 (1) (化 1)、一般式 (2) (化 2)、または、一般式 (3) (化 3) で示される炭素数が 2 から 4 の脂肪族アルデヒド化合物に対し、アセトアルデヒドを 1 分子アルドール縮合することで、一般式 (4) (化 4)、一般式 (5) (化 5)、または、一般式 (6) (化 6) で示される炭素数が 2 増加したアルデヒド化合物を製造する、請求項 1、または、請求項 2 記載の方法 (式 1 ~ 式 6 中、R 1 は、水素原子、水酸基、ハロゲン原子、アジド基、カルボキシル基、または炭素数が 1 から 4 のアルコキシ基を示し、R 2 は、水素原子、水酸基、メチル基を示し、R 3 は、水素原子、水酸基を示す。 )。

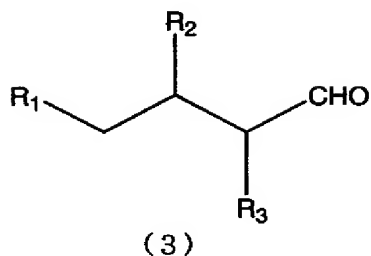
【化 1】



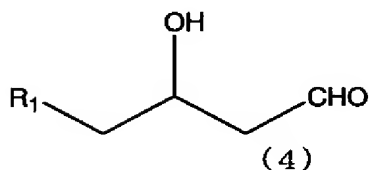
【化 2】



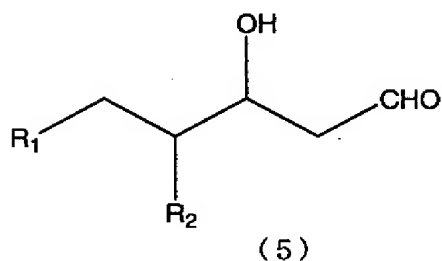
【化 3】



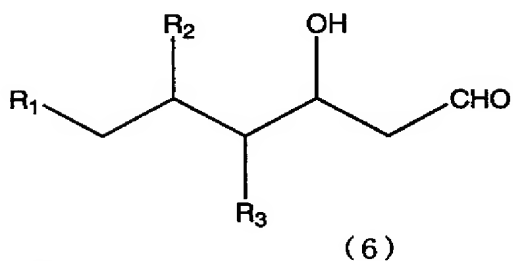
【化 4】



【化 5】



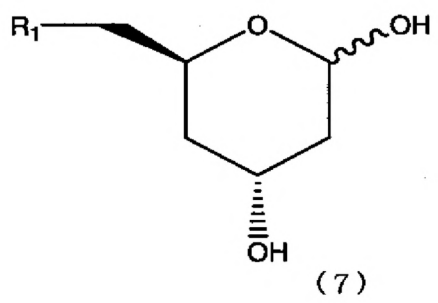
【化 6】



【請求項 4】

一般式（１）（化１）で示される炭素数が２から４の脂肪族アルデヒド化合物に対し、アセトアルデヒドを１分子アルドール縮合し、炭素数が２増加したアルデヒド化合物を製造し、得られた該炭素数が２増加したアルデヒド化合物に対し、さらに２分子目のアセトアルデヒドを連続してアルドール縮合することで、一般式（７）（化７）で示される化合物を製造する方法であって、炭素数が２から４の脂肪族アルデヒド化合物と、２回のアルドール縮合において添加されるアセトアルデヒドの合計モル数に対し、D-2-デオキシリボース-5-リン酸アルドラーゼを約 0.1 U/mm o l 以上 120 U/mm o l 以下の割合で加え（1 U は、25℃で１分間当たり 1 μ m o l の D-2-デオキシリボース-5-リン酸を D-グリセルアルデヒド-3-リン酸とアセトアルデヒドに分解する酵素量を表す）、且つ２回のアルドール縮合を単一容器中で反応させることを特徴とする請求項 1、または、請求項 2 記載の方法（式 7 中、R1 は、水素原子、水酸基、ハロゲン原子、アジド基、カルボキシル基、または炭素数が 1 から 4 のアルコキシ基を示す。）。

【化 7】



【書類名】 明細書

【発明の名称】 キラルなヒドロキシアльデヒド化合物の製造方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、炭素数が2から4の脂肪族アルデヒド化合物に対し、アセトアルデヒドを1分子アルドール縮合する、もしくはさらに2分子目のアセトアルデヒドをアルドール縮合することで、2または4炭素の炭素数が増加したアルデヒド化合物を製造する方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

D-2-デオキシリボース-5-リン酸アルドラーゼ (EC 4. 1. 2. 4) (以下DERAと略称) は、グリセルアルデヒド-3-リン酸とアセトアルデヒドを基質とし、アルドール縮合によりD-2-デオキシリボース-5-リン酸の合成を触媒する酵素である。中でも大腸菌由来のDERAについては、その反応性が詳細に解析されており、比較的広い基質特異性を持ち、非天然の合成基質からキラル化合物を合成することが報告されている。(Angew. Chem. Int. Ed. vol. 39, pp. 1352-1374 (2000))

【0003】

しかし、従来知られているDERAによる上述のような非天然基質に対する活性は極端に低く、反応には大量の酵素を必要とする。例えば、米国特許5, 795, 749号公報には、4-置換-3-ヒドロキシブチルアルデヒド中間体を經由する、2, 4, 6-トリデオキシヘキソース誘導体の合成が記述されているが、基質であるアセトアルデヒドと置換アセトアルデヒドとの合計モル数に対し、D-2-デオキシリボース-5-リン酸アルドラーゼを約125 U~150 U/mmolという高用量で加える必要があり、必ずしも工業的に実施しうる方法ではなかった。

【0004】

【特許文献1】 米国特許5, 795, 749号公報

【非特許文献1】 Angew. Chem. Int. Ed. vol. 39, pp. 1352-1374 (2000)

【非特許文献2】 Nature vol. 399, pp. 323-329 (1999)

【非特許文献3】 Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. vol. 99 pp. 984-989 (2002)

【非特許文献4】 Molecular Cloning, A laboratory manual, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、従来のDERAを用いたアルドール縮合の、非天然基質に対する活性が低いという問題を解決し、非天然基質を用いた3-ヒドロキシブチルアルデヒド誘導体、D-2-デオキシリボース誘導体、及び2, 4, 6-トリデオキシヘキソース誘導体を製造する工業的方法を提供することを目的としている。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは、詳細な基質特異性の解析がなされていなかった超好熱性菌由来DERAに着目し、非天然基質を用いた2, 4, 6-トリデオキシヘキソース誘導体、及び、D-2-デオキシリボース誘導体の合成に関する反応性を解析した。その結果、超好熱性菌サーモトガ・マリティマ (Thermotoga maritima) 由来DERA、または、超好熱性菌パイロバキュラム・アエロフィラム (Pyrobaculum aer

ophylum) 由来 D E R A を用いることにより、既に報告されている大腸菌由来 D E R A を用いた場合と比較し、上記誘導体の生産性が著しく向上することを見出した。

#### 【0007】

サーモトーガ・マリティマ及びバイロバキュラム・アエロフィラムについては、ゲノム情報が公開されており (Nature vol. 399, pp. 323-329 (1999)、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. vol. 99 pp. 984-989 (2002))、これらの情報を基に大腸菌由来 D E R A との相溶性から各菌株の D E R A をコードしていると思われる D N A 配列が推定されている。しかしながらこれら超好熱性菌由来 D E R A の基質特異性についての詳細な解析はなされておらず、特に非天然基質を用いたアルドール縮合への応用性は全く未知であった。

#### 【0008】

本発明者は、精製したサーモトーガ・マリティマ由来 D E R A、及び、バイロバキュラム・アエロフィラム由来 D E R A の天然基質に対する反応性、即ち、D-2-デオキシリボース-5-リン酸の分解活性を調査し、同じく精製した大腸菌由来 D E R A と比較し、概して遥かに低い活性しか示さないことを確認した。ところが、非天然基質を用いた 3-ヒドロキシブチルアルデヒド誘導体、D-2-デオキシリボース誘導体、及び、2, 4, 6-トリデオキシヘキソース誘導体の合成活性を調査したところ、サーモトーガ・マリティマ由来 D E R A、及び、バイロバキュラム・アエロフィラム由来 D E R A は、大腸菌由来 D E R A と比較し、大幅に高いアルドール縮合活性を示すことを見出した。

#### 【0009】

驚くべきことに、サーモトーガ・マリティマ由来 D E R A、及び、バイロバキュラム・アエロフィラム由来 D E R A の前述の非天然基質に対するアルドール縮合活性は、25℃前後の常温域においても、大腸菌由来 D E R A での活性を上回っていた。一般に超好熱性菌由来の酵素は、本来の生育温度である高温域を反応の至適温度としており、常温域での活性は低い。従って、非天然基質を用いたアルドール縮合反応性において、超好熱性菌由来 D E R A が常温菌である大腸菌由来 D E R A と比較し、常温域においても大幅に高い活性を示すことは全く予想外であった。低沸点のアルデヒド化合物を基質に用いる場合、超好熱性菌由来 D E R A の至適温度では基質の溶解性が低下するため、高温域での反応は不利になる。本発明により見出された、非天然基質のアルドール縮合反応における、サーモトーガ・マリティマ由来 D E R A、及び、バイロバキュラム・アエロフィラム由来 D E R A の至適温度域の広さは、これら酵素の広い基質反応への適用の可能性を示すものである。

#### 【0010】

このように本発明は、非天然基質を用いたアルドール縮合反応への応用性は未知であった超好熱性菌由来 D E R A の効果について初めて実証し、明らかにしたものである。

#### 【0011】

即ち、本発明は以下の通りである。

[1] 炭素数が 2 から 4 の脂肪族アルデヒド化合物に対し、アセトアルデヒドを 1 分子アルドール縮合することで、炭素数が 2 増加したアルデヒド化合物を製造する方法、もしくはアルドール縮合により得られた該アルデヒド化合物に対し、さらにアセトアルデヒドを 1 分子アルドール縮合することで、炭素数が 4 増加したアルデヒド化合物を製造する方法であって、該アルドール縮合を下記の (1) または (2) の特徴を有する D-2-デオキシリボース-5-リン酸アルドラーゼ、または該酵素を含む細胞またはその処理物の存在下に行うことを特徴とする方法。

(1) 少なくとも配列番号 1 に示されたアミノ酸配列を有する、

(2) 少なくとも配列番号 1 記載のアミノ酸配列の、1 ないし数個のアミノ酸が欠失、または他のアミノ酸残基に置換され、或いは他のアミノ酸残基が挿入されたアミノ酸配列を有し、かつ炭素数が 2 から 4 の脂肪族アルデヒド化合物に対し、アセトアルデヒドを 1 分子アルドール縮合する、もしくはさらに 2 分子目のアセトアルデヒドをアルドール縮合する活性を有する。



【2】炭素数が2から4の脂肪族アルデヒド化合物に対し、アセトアルデヒドを1分子アルドール縮合することで、炭素数が2増加したアルデヒド化合物を製造する方法、もしくはアルドール縮合により得られた該アルデヒド化合物に対し、さらにアセトアルデヒドを1分子アルドール縮合することで、炭素数が4増加したアルデヒド化合物を製造する方法であって、該アルドール縮合を下記の(1)または(2)の特徴を有するD-2-デオキシリボース-5-リン酸アルドラーゼ、または該酵素を含む細胞またはその処理物の存在下に行うことを特徴とする方法。

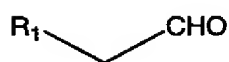
(1) 少なくとも配列番号2に示されたアミノ酸配列を有する、

(2) 少なくとも配列番号2記載のアミノ酸配列の、1ないし数個のアミノ酸が欠失、または他のアミノ酸残基に置換され、或いは他のアミノ酸残基が挿入されたアミノ酸配列を有し、かつ炭素数が2から4の脂肪族アルデヒド化合物に対し、アセトアルデヒドを1分子アルドール縮合する、もしくはさらに2分子目のアセトアルデヒドをアルドール縮合する活性を有する。

【3】一般式(1)(化1)、一般式(2)(化2)、または、一般式(3)(化3)で示される炭素数が2から4の脂肪族アルデヒド化合物に対し、アセトアルデヒドを1分子アルドール縮合することで、一般式(4)(化4)、一般式(5)(化5)、または、一般式(6)(化6)で示される炭素数が2増加したアルデヒド化合物を製造する、【1】または【2】の方法(式1～式6中、R1は、水素原子、水酸基、ハロゲン原子、アジド基、カルボキシル基、または炭素数が1から4のアルコキシ基を示し、R2は、水素原子、水酸基、メチル基を示し、R3は、水素原子、水酸基を示す。 )。

【0012】

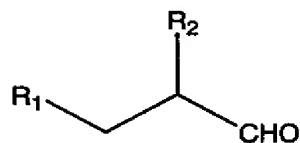
【化1】



(1)

【0013】

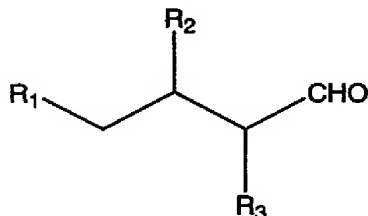
【化2】



(2)

【0014】

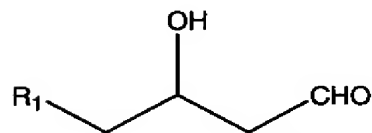
【化3】



(3)

【0015】

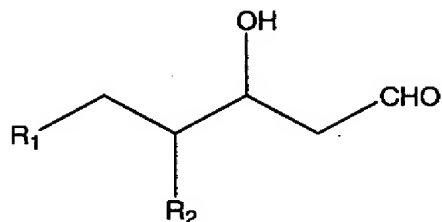
【化4】



(4)

【 0 0 1 6 】

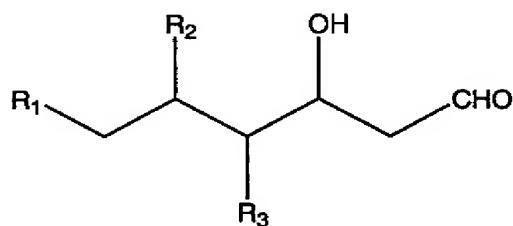
【化 5】



(5)

【 0 0 1 7 】

【化 6】



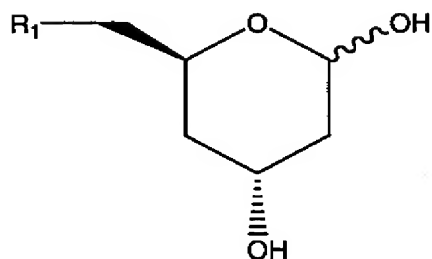
(6)

【 0 0 1 8 】

【 4 】 一般式 ( 1 ) ( 化 1 ) で示される炭素数が 2 から 4 の脂肪族アルデヒド化合物に対し、アセトアルデヒドを 1 分子アルドール縮合し、炭素数が 2 増加したアルデヒド化合物を製造し、得られた該炭素数が 2 増加したアルデヒド化合物に対し、さらに 2 分子目のアセトアルデヒドを連続してアルドール縮合することで、一般式 ( 7 ) ( 化 7 ) で示される化合物を製造する方法であって、炭素数が 2 から 4 の脂肪族アルデヒド化合物と、2 回のアルドール縮合において添加されるアセトアルデヒドの合計モル数に対し、D-2-デオキシリボース-5-リン酸アルドラーゼを約 0.1 U/mm o l 以上 120 U/mm o l 以下の割合で加え ( 1 U は、25℃で 1 分間当たり 1 μ m o l の D-2-デオキシリボース-5-リン酸を D-グリセルアルデヒド-3-リン酸とアセトアルデヒドに分解する酵素量を表す)、且つ 2 回のアルドール縮合を単一容器中で反応させることを特徴とする [ 1 ] または [ 2 ] 記載の方法 ( 式 7 中、R1 は、水素原子、水酸基、ハロゲン原子、アジド基、カルボキシル基、または炭素数が 1 から 4 のアルコキシ基を示す。 ) 。

【 0 0 1 9 】

【化 7】



(7)

【発明の効果】

【 0 0 2 0 】

超好熱性菌サーモトーガ・マリティマまたはパイロバキュラム・アエロフィラム由来 D E R A を用いることにより、従来の大腸菌由来 D E R A を用いての方法と比較し、非天然基質を用いたアルドール縮合活性を著しく向上させることができ、反応容器当りの生産性を向上させることができる。また、超好熱性菌由来 D E R A の特徴である耐熱性、酵素安

定性を利用し、大腸菌由来 D E R A よりも簡便且つ効率的に酵素を精製し、反応に供することが可能となった。

【発明を実施するための最良の形態】

【0021】

本発明において用いられるサーモトーガ・マリティマ由来 D E R A とは、ジャパン コレクション オブ マイクロオオーガニズムズ ( J a p a n C o l l e c t i o n o f M i c r o o r g a n i s m s ( J C M ) ) から入手できるサーモトーガ・マリティマ ( J C M 番号 1 0 0 9 9 ) より得られ、配列番号 1 に示すアミノ酸配列を有する酵素を指す。前記のアミノ酸配列は、本発明に見られる効果が保持されている限りにおいて、配列番号 1 に示すアミノ酸配列の 1 ないし数個のアミノ酸が欠失、または他のアミノ酸残基に置換され、或いは他のアミノ酸残基が挿入されるといった変異が導入された配列であっても良い。

【0022】

本発明において用いられるパイロバキュラム・アエロフィラム由来 D E R A とは、J C M から入手できるパイロバキュラム・アエロフィラム ( J C M 番号 9 6 3 0 ) より得られ、配列番号 2 に示すアミノ酸配列を有する酵素を指す。前記のアミノ酸配列は、本発明に見られる効果が保持されている限りにおいて、配列番号 1 に示すアミノ酸配列の 1 ないし数個のアミノ酸が欠失、または他のアミノ酸残基に置換され、或いは他のアミノ酸残基が挿入されるといった変異が導入された配列であっても良い。

【0023】

本発明において、「少なくとも配列番号 1 ( 又は配列番号 2 ) に示されたアミノ酸配列を有する」、或いは「少なくとも配列番号 1 ( 又は配列番号 2 ) 記載のアミノ酸配列の、1 ないし数個のアミノ酸が欠失、または他のアミノ酸残基に置換され、或いは他のアミノ酸残基が挿入されたアミノ酸配列を有する」とは、それぞれの配列番号に示されたアミノ酸配列或いはそれぞれの配列番号に示されたアミノ酸配列が置換、欠失又は挿入されて得られたアミノ酸配列をその配列のまま含み、しかもそれらアミノ酸配列を有する酵素の酵素活性を損なわれない ( 又は実質的に変化しない ) 範囲で、そのアミノ酸配列の N 末端又は C 末端にアミノ酸残基の付加が許容されるということである。この場合許容されるアミノ酸残基の長さは例えば 1 ~ 5 0 アミノ酸残基、好ましくは 1 ~ 3 0 アミノ酸残基、更に好ましくは 1 ~ 2 0 アミノ酸残基である。

【0024】

以下の実施例等においては、本来の酵素のアミノ酸配列にアミノ酸残基の付加された、本発明における「少なくとも配列番号 1 ( 又は配列番号 2 ) に示されたアミノ酸配列を有する」アミノ酸配列の蛋白質及びその効果が開示されているが、いうまでもなくこの効果は本来のアミノ酸残基の付加のない酵素の有する効果と相違ないものである。

【0025】

本発明において用いられるサーモトーガ・マリティマ由来 D E R A 、または、パイロバキュラム・アエロフィラム由来 D E R A の調製にあたっては、其々サーモトーガ・マリティマ、または、パイロバキュラム・アエロフィラムのゲノム D N A より該遺伝子を単離し、適切な発現ベクターに挿入して発現させることができる。また、配列番号 1 又は配列番号 2 に記載の塩基配列を有する D N A を D N A シンセシザー等を用いて合成し、得られた D N A を適切な発現ベクターに挿入して発現させることによって取得可能である。本発明に用いられる発現ベクターは、市販の発現ベクターであり、宿主において D E R A を発現するベクターであれば良く、例えば p E T 1 5 b ( N o v a g e n 社製 ) 等が挙げられる。単離された遺伝子を大量発現させるためには、高発現ベクターの有する転写調節配列および翻訳調節配列の制御下に、作動可能に連結することが好ましい。サーモトーガ・マリティマ由来 D E R A 遺伝子、または、パイロバキュラム・アエロフィラム由来 D E R A 遺伝子の塩基配列を、配列番号 1 、及び、配列番号 2 に示す。前記の 2 種の塩基配列は、本発明に見られる効果が保持されている限りにおいて、配列番号 1 に示すアミノ酸配列の 1 ないし数個のアミノ酸が欠失、または他のアミノ酸残基に置換され、或いは他のアミノ

酸残基が挿入されるといった変異が導入された配列であっても良い。

【0026】

このようにして得られたベクターを用いて任意の適切な宿主細胞に形質転換する場合、宿主細胞としては、細菌、酵母等、目的とする遺伝子を発現出来るものであればいずれも利用することができるが、取扱いの容易さから大腸菌が最適に用いられる。大腸菌株としては、例えばBL21【DE3】株（Novagen社製）等が挙げられる。形質転換等、遺伝子組換えの手法に関しては、Molecular Cloning, A laboratory manual, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)等に記載されている方法に準じて行うことができる。サーモトーガ・マリティマ由来DERA、または、パイロバキュラム・アエロフィラム由来DERAを産生する方法としては、形質転換された宿主細胞を適切な条件下で培養し、その培養物から目的とする酵素を精製する方法が挙げられる。培養に用いられる培地は、例えばLB培地、および2×YT培地のような通常微生物の増殖に用いられる培地であっても良いし、宿主細胞に適した特定の培地であっても良い。培養は、連続的あるいは回分的に行うことができる。

【0027】

また反応に用いられるサーモトーガ・マリティマ由来DERA、または、パイロバキュラム・アエロフィラム由来DERAは、該DERAを強制発現させた組換え細胞より精製したものであっても良いし、該DERAを強制発現させた組換え細胞そのものを用いても良い。サーモトーガ・マリティマ由来、または、パイロバキュラム・アエロフィラム由来DERAを強制発現させた組換え宿主細胞そのものを反応に用いる場合、該DERAが高い耐熱性を有するが故に、熱処理により宿主細胞の死菌化、及び、宿主細胞由来酵素の失活を簡便に行うことができる。

【0028】

本発明におけるアルドール縮合は、サーモトーガ・マリティマ由来DERA、または、パイロバキュラム・アエロフィラム由来DERAと、基質である炭素数が2から4の脂肪族アルデヒド化合物とアセトアルデヒド、及び、pH緩衝剤を含む水溶液中で実施される。

【0029】

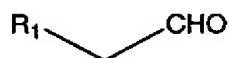
基質として用いられる炭素数が2から4の脂肪族アルデヒド化合物は、一般式(1)（化8）で示される化合物、または、一般式(2)（化9）で示される化合物、または、一般式(3)（化10）で示される化合物の中から選択される。これら脂肪族アルデヒド化合物に対し、アセトアルデヒドを1分子アルドール縮合することで、一般式(4)（化11）、または、一般式(5)（化12）、または、一般式(6)（化13）で示される炭素数が2増加したアルデヒド化合物が合成される。また、一般式(1)（化8）で示される炭素数が2から4の脂肪族アルデヒド化合物に対し、アセトアルデヒドを1分子アルドール縮合し、さらに2分子目のアセトアルデヒドを連続してアルドール縮合することで、一般式(7)（化14）で示される化合物が合成される。

【0030】

尚、一般式(1)～(7)中のR1は、水素原子、水酸基、ハロゲン原子、アジド基、カルボキシ基、または炭素数が1から4のアルコキシ基から選択される。R2は、水素原子、水酸基、メチル基から選択される。また、R3は、水素原子、水酸基から選択される。

【0031】

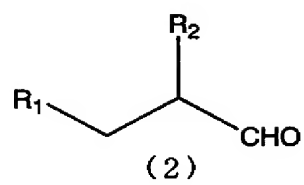
【化8】



(1)

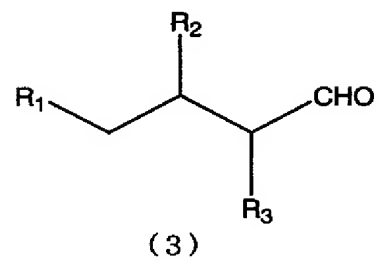
【0032】

【化 9】



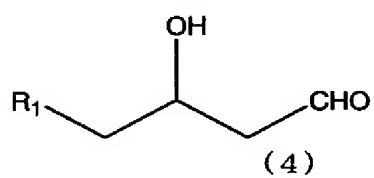
【 0 0 3 3 】

【化 1 0】



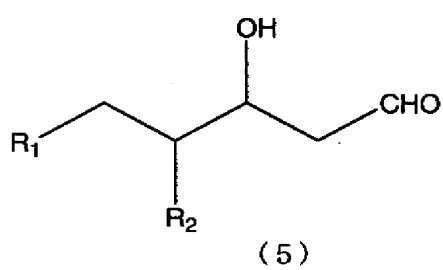
【 0 0 3 4 】

【化 1 1】



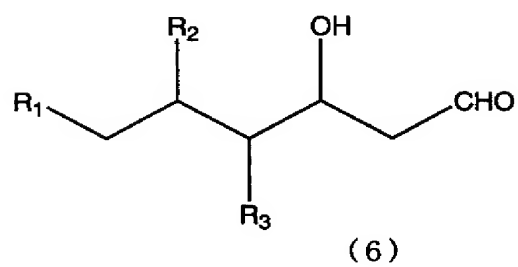
【 0 0 3 5 】

【化 1 2】



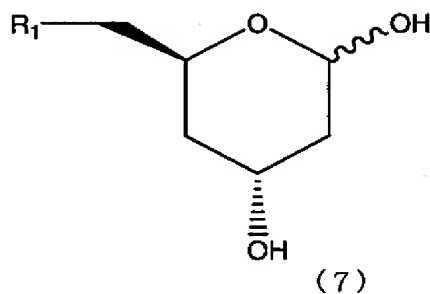
【 0 0 3 6 】

【化 1 3】



【 0 0 3 7 】

【化 1 4】



【0038】

一般式(2)で示される化合物としては例えばハロゲン化アセトアルデヒドが例示でき、特にクロロアセトアルデヒドは本発明の効果が顕著に現れるが故に好適に使用される。クロロアセトアルデヒドに対し、アセトアルデヒドを1分子アルドール縮合することで、炭素数が2増加した4-クロロ-3-ヒドロキシブチルアルデヒドが合成され、さらに2分子目のアセトアルデヒドを連続してアルドール縮合することで、炭素数が4増加した6-クロロ-2, 4, 6-トリデオキシヘキソースが合成される。一般式(3)で示される化合物では、代表的なものとしてD-グリセルアルデヒドが例示できる。DERAは生体内では本来D-グリセルアルデヒド-3-リン酸とアセトアルデヒドを基質とするが、本発明において基質として用いる炭素数が2から4の脂肪族アルデヒド化合物は、D-グリセルアルデヒド-3-リン酸を含まないものとする。D-グリセルアルデヒドに対しアセトアルデヒドを1分子アルドール縮合することで、D-2-デオキシリボースが合成される。一般式(4)で示される化合物としては例えばD-エリトロースが例示できる。D-エリトロースに対しアセトアルデヒドを1分子アルドール縮合することで、D-2-デオキシアロースが合成される。

【0039】

炭素数が2から4の脂肪族アルデヒド化合物とアセトアルデヒドの反応容器中でのモル比は、1:1から1:4の間で目的物の実生産において生産性が最適となるモル比に設定することができる。例えば、反応生成物である4-クロロ-3-ヒドロキシブチルアルデヒドと6-クロロ-2, 4, 6-トリデオキシヘキソースは、基質であるクロロアセトアルデヒドとアセトアルデヒドのモル比を調整することにより、その生成比を制御することが可能である。クロロアセトアルデヒドに対し、アセトアルデヒドを1分子アルドール縮合することで、4-クロロ-3-ヒドロキシブチルアルデヒドを合成する場合、クロロアセトアルデヒドとアセトアルデヒドのモル比は、1:1~1:1.5の間で選択される。また、アセトアルデヒドを2分子アルドール縮合することで、6-クロロ-2, 4, 6-トリデオキシヘキソースを合成する場合、クロロアセトアルデヒドとアセトアルデヒドのモル比は、1:2~1:4の間で選択される。

【0040】

本発明での反応に用いる基質濃度、酵素用量は以下の範囲で規定される。即ち、炭素数が2から4の脂肪族アルデヒド化合物とアセトアルデヒドの合計モル数に対し、DERAを約0.1 U/mm o l以上、120 U/mm o l以下で加え、単一容器中で反応させる。1 Uは、25℃で1分間当たり1 μ m o lのD-2-デオキシリボース-5-リン酸をD-グリセルアルデヒド-3-リン酸とアセトアルデヒドに分解する酵素量と定義し、分解によって生じるD-グリセルアルデヒド-3-リン酸をトリオースリン酸イソメラーゼでジヒドロキシアセトンリン酸に変換し、これをグリセロール-3-リン酸脱水素酵素で反応させた際のNADH(ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド還元型)の減少で測定する。この範囲内で反応を実施するにあたっては、容器中での反応の進行を適宜観測し、基質、及び、酵素を追加添加することにより、反応生成物の高濃度蓄積を行うことも可能である。

【0041】

また、本発明での反応におけるpH範囲、反応温度は、サーモトーガ・マリティマ由来DERA、または、パイロバキュラム・アエロフィラム由来DERAが良好な反応性を有する範囲であれば、いかなる条件でも採用可能である。例えば、反応液のpH範囲は、好ましくはpH4～12、さらに好ましくはpH5～9で実施され、この範囲内において十分な緩衝作用を有する任意のpH緩衝剤が利用できる。反応温度は0～120℃の範囲内で選択可能であるが、低沸点のアルデヒド化合物を基質とする場合等は、10～50℃の範囲内での実施が好適である。

#### 【0042】

本発明において、炭素数が2から4の脂肪族アルデヒド化合物に対し、アセトアルデヒドを1分子アルドール縮合し、さらに2分子目のアセトアルデヒドをアルドール縮合することで、炭素数が4増加したアルデヒド化合物を製造する場合、この2段階の反応は単一容器中で連続して行われる。反応に要する時間は反応生成物が十分に蓄積されるまで任意に設定することができる。反応生成物は通常、反応停止後の反応液より共沸蒸留、または晶析により分離、回収するが、反応液のままで各種の保護修飾、例えば、ケトン類をはじめとする修飾剤を用いてヒドロキシル基にアセタール修飾による保護を加えた後に回収しても良い。また生成物であるアルデヒド化合物を適当な条件で酸化し、アルドン酸、またはラクトン体として回収しても良い。

#### 【0043】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例により何ら限定されるものではない。

#### 【実施例1】

#### 【0044】

サーモトーガ・マリティマ由来DERAの調製

##### (1) サーモトーガ・マリティマ染色体DNAの調製

サーモトーガ・マリティマの培養には、JCM237培地（以下のように調製する。5.0g 可溶性デンプン、0.5g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、15.0ml 添加ミネラル液（蒸留水1lあたり、1.5g *Nitrilotriacetic acid*、3.0g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.5g  $\text{MnSO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ 、1.0g  $\text{NaCl}$ 、0.1g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.1g  $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.1g  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.01g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、0.01g  $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ 、0.01g  $\text{H}_3\text{BO}_3$ 、0.01g  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ を組成とし、まず*Nitrilotriacetic acid*を溶解しKOHによりpHを6.5に調製した後、残りのミネラルを添加して、pH7.0に調製したミネラル液）、2.0mg  $\text{NiCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、20.0g  $\text{NaCl}$ 、0.5g *Bactoyeast extract*（Difco社製）、1.0mg *Resazurin*、0.5g  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 、250ml 人工海水（蒸留水1lあたりに27.7g  $\text{NaCl}$ 、7.0g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、5.5g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.65g  $\text{KCl}$ 、0.1g  $\text{NaBr}$ 、30.0mg  $\text{H}_3\text{BO}_3$ 、15.0mg  $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、10.0mg *Citric acid*、0.05mg  $\text{KI}$ 、2.25g  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ を溶解した組成液）、蒸留水 750mlの組成物で、 $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ を除く組成物を混合しpHを $\text{H}_2\text{SO}_4$ により6.5に調製する。窒素雰囲気下でフィルター濾過により無菌化する。5%溶液として $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ を中和し、窒素雰囲気下でオートクレーブする。植菌前に、殺菌した $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ を添加し、必要に応じてpHを6.5に調製する。）を用いた。保存菌株（JCM番号10099）を、脱気後、窒素通気により嫌気条件を維持しながら、80℃で、24から96時間、マグネチックスターラーにより攪はん培養し、2lの培養液を調製した。培養終了後、得られた培養液中の菌体を遠心分離（5000g、10分間）により集菌し、3%  $\text{NaCl}$ で洗菌を行った。菌体湿重量2gの菌体を8mlのTE緩衝液（10mM *Tris-HCl*（pH7.5）、1mM EDTA）に懸濁した。この菌体懸濁液に10mg/ml *Lysozyme*溶液 2ml、10mg/ml *RNase*溶液 100μlを加え37℃で、30分間イ

ンキュベーションした後、 $20\text{ mg/ml}$  Proteinase K溶液  $50\text{ }\mu\text{l}$ を加え、 $10$ 分後、 $30\text{ mg/ml}$  N-Lauroyl sarcosine Na溶液  $1\text{ ml}$ を加えて、さらに $45$ 分間インキュベーションした。当量のC I（クロロホルム：イソアミルアルコール＝ $24:1$ ）を加え穏やかに混和し、遠心分離（ $7000\text{ g}$ 、 $15$ 分間）して、水層を分取した。同じ操作をもう一度繰り返した後に、P C I（水平衡化フェノール：C I＝ $1:1$ ）処理をC I処理と同様に $2$ 回繰り返した。さらに $2$ 回C I処理した後、 $0.1$ 倍量の $3\text{ M}$  酢酸ナトリウムを加えて攪拌し、当量のイソプロパノールを加えて軽く攪拌した。析出したDNAをディスポチューブで巻き取り、 $70\%$ エタノールで、洗浄し乾燥させ、TE緩衝液  $500\text{ }\mu\text{l}$ に溶解することにより、サーモトーガ・マリティマ染色体DNAを得た。

#### 【0045】

〔2〕サーモトーガ・マリティマDERA遺伝子のクローニング、及び、発現大腸菌株の調製

サーモトーガ・マリティマ染色体DNAを鋳型とし、配列番号3及び配列番号4に記載の配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いたPCRにより、配列番号1のサーモトーガ・マリティマ由来DERA遺伝子を含むDNA断片を得た。得られたDNA断片を、制限酵素Nde I、BamHIを用いて処理し、同じくNde I、BamHIを用いて処理した市販の発現ベクターpET15b（Novagen社製）にライゲーションすることにより、サーモトーガ・マリティマ由来DERA発現プラスミドpET15b-TM1559を得た。この発現プラスミドを用いて大腸菌BL21【DE3】株（Novagen社製）を形質転換し、サーモトーガ・マリティマ由来DERA発現大腸菌株BL21【DE3】／pET15b-TM1559を得た。

#### 【0046】

〔3〕組換え大腸菌からのサーモトーガ・マリティマ由来DERAの精製

組換え大腸菌株BL21【DE3】／pET15b-TM1559は、 $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ アンピシリンを含むSB（ $1\text{ L}$ 中、トリプトン  $12\text{ g}$ 、酵母エキス  $24\text{ g}$ 、グリセロール  $5\text{ ml}$ 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$   $12.5\text{ g}$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $3.8\text{ g}$ ）培地 $100\text{ ml}$ に植菌し、 $37^\circ\text{C}$ で、 $\text{OD}_{660}=0.6$ になるまで培養した後、終濃度が $1\text{ mM}$ になるようにIPTG（イソプロピル- $\beta$ -チオガラクトピラノシド）を加え、さらに $3$ 時間培養した。培養終了後、遠心分離（ $5000\text{ g}$   $10$ 分間）により、集菌し、 $0.85\%$  NaCl溶液で、洗菌し、湿菌体重量の $9$ 倍量の $10\text{ mM}$  Tris-HCl（ $\text{pH}7.5$ ）緩衝液に懸濁させ、超音波破碎後、遠心分離し、上清を粗酵素液とした。粗酵素液を $80^\circ\text{C}$ で、 $10$ 分間熱処理し、遠心分離により熱変性した不溶性蛋白質を除去した。ニッケルを配位させた金属アフィニティークラム（Hi Trap affinity columns（Pharmacia Biotech社製））に、 $0.5\text{ M}$  NaCl、 $10\text{ mM}$  イミダゾールを含む $10\text{ mM}$  Tris-HCl（ $\text{pH}7.5$ ）緩衝液で、平衡化した後、熱処理後の不溶性蛋白質を除去した粗酵素液を吸着させ、イミダゾール濃度を $0.1\text{ M}$ 、 $0.2\text{ M}$ 、 $0.3\text{ M}$ 、 $0.4\text{ M}$ 、 $0.5\text{ M}$ と段階的に上昇させて、活性画分を回収した。各画分の $50^\circ\text{C}$ におけるDERA活性を、参考例2記載の方法に従い確認した。こうして得られたサーモトーガ・マリティマ由来DERAの純度をSDS-PAGEにて分析し、均一に精製されていることを確認した。またその蛋白質量は、Bio-Rad Protein Assayキット（Bio-Rad社製）を用いて定量した。

#### 【実施例2】

#### 【0047】

バイロバキュラム・アエロフィラム由来DERA発現大腸菌株の調製

バイロバキュラム・アエロフィラムの培養は、JCM215培地（以下に調製法をしめす。 $125\text{ ml}$  海洋培地／合成海水混合液（ $47.15\text{ g}$  NaCl、 $18.10\text{ g}$   $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $7.0\text{ g}$   $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $3.13\text{ g}$   $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $3.24\text{ g}$   $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 、 $0.1\text{ g}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 、 $0.1\text{ g}$  NaBr、 $80.0\text{ mg}$  KBr、 $72.0\text{ mg}$   $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $52.0\text{ mg}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$



、8.1mg  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、2.4mg  $\text{NaF}$ 、0.4mg  $\text{Sodium silicate}$ 、0.05mg  $\text{KI}$ を1lの蒸留水に溶解した溶液)、10.0ml 添加ミネラル液(蒸留水1lあたり、1.5g  $\text{Nitrilotriacetic acid}$ 、3.0g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.5g  $\text{MnSO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ 、1.0g  $\text{NaCl}$ 、0.1g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.1g  $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.1g  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.01g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、0.01g  $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ 、0.01g  $\text{H}_3\text{BO}_3$ 、0.01g  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ を組成とし、まず $\text{Nitrilotriacetic acid}$ を溶解し $\text{KOH}$ により $\text{pH}$ を6.5に調製した後、残りのミネラルを添加して、 $\text{pH}$ 7.0に調製したミネラル液)、2.0mg  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.25g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、2.0mg  $(\text{NH}_4)_2\text{Ni}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.1mg  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ 、0.1mg  $\text{NaWO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、2.2g  $\text{NaHCO}_3$ 、0.07g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.5g  $\text{Bactoyeast extract}$ (Difco社製)、1.0g  $\text{NaS}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、865.0ml 蒸留水を混合溶解し、1N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ で $\text{pH}$ を7.0に調整後、フィルター濾過により滅菌した。窒素・二酸化炭素・酸素の混合比が80:20:1の組成の気体雰囲気下で培地を培養器に入れた。)を用い植菌後200kPaに加圧して、95℃で培養した。パイロバキュラム・アエロフィラム染色体DNAは、保存菌株(JCM番号9630)より実施例1と同様の方法で調製した。パイロバキュラム・アエロフィラム染色体DNAを鋳型とし、配列番号5及び配列番号6に記載の配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いたPCRにより、配列番号2のパイロバキュラム・アエロフィラム由来DERA遺伝子を含むDNA断片を得た。パイロバキュラム・アエロフィラム由来DERA遺伝子の開始コドンGTGは大腸菌での発現のためATGに変更した。配列番号2には変更後のDNA配列を示している。

#### 【0048】

得られたDNA断片を、制限酵素NdeI、BamHIを用いて処理し、同じくNdeI、BamHIを用いて処理した市販の発現ベクターpET15bにライゲーションすることにより、パイロバキュラム・アエロフィラム由来DERA発現プラスミドpET15b-pAE1231を得た。この発現プラスミドを用いて大腸菌BL21[DE3]株を形質転換し、パイロバキュラム・アエロフィラム由来DERA発現大腸菌株BL21[DE3]/pET15b-pAE1231を得た。

組換え大腸菌株BL21[DE3]/pET15b-pAE1231からのパイロバキュラム・アエロフィラム由来DERAの精製は実施例1の〔3〕に記載の方法と同様の方法に従った。

#### 【0049】

##### 【参考例1】 大腸菌由来DERAの精製

サーモトーガ・マリティマ由来DERA、及び、パイロバキュラム・アエロフィラム由来DERAの非天然基質に対する反応性を、先行例である大腸菌由来のDERAと比較するため、大腸菌由来DERAの精製を行った。アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(American type culture collection(ATCC))から入手できる大腸菌W3110(ATCC番号27325)培養菌体より、実施例1と同様の方法で調製した大腸菌染色体DNAを鋳型とし、配列番号7及び配列番号8に記載の配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いたPCRにより、大腸菌由来DERA遺伝子を含むDNA断片を得た。この大腸菌由来DERA遺伝子を含むDNA断片を、制限酵素NdeI、BamHIを用いて処理し、同じくNdeI、BamHIを用いて処理した市販の発現ベクターpET11b(Novagen社製)にライゲーションすることにより、大腸菌由来DERA発現プラスミドpET11b-DERAを得た。この発現プラスミドを用いて大腸菌BL21[DE3]株を形質転換し、大腸菌由来DERA発現大腸菌株BL21[DE3]/pET11b-DERAを得た。組換え大腸菌から実施例1の方法に従って粗酵素液を調製し、硫酸沈殿(50~70%飽和濃度)での分画後、50mM Tris-HCl(pH7.5)緩衝液に透析した。この粗酵素液

を、P h e n y l 5 P W疎水クロマトグラフィー（東ソー製）にかけ、1～0 M 硫酸を含む50 mM T r i s-HC l（p H 7. 5）緩衝液の直線濃度勾配にて溶出し、各画分の25℃におけるD E R A活性を、参考例2記載の方法に従い確認した。得られた活性画分をS D S-P A G Eにて分析し、大腸菌由来D E R Aが均一に精製されていることを確認した。蛋白質量は、B i o-R a d P r o t e i n A s s a yキットを用いて定量した。

#### 【0050】

##### 【参考例2】 D-2-デオキシリボース-5-リン酸分解活性の比較

実施例1で得られたサーモトーガ・マリティマ由来D E R A、実施例2で得られたパイロバキュラム・アエロフィラム由来D E R A、及び、参考例1で得られた大腸菌由来D E R Aの25℃でのD-2-デオキシリボース-5-リン酸分解活性を、分解によって生じるD-グリセルアルデヒド-3-リン酸をトリオースリン酸イソメラーゼでジヒドロキシアセトンリン酸に変換し、これをグリセロール-3-リン酸脱水素酵素で反応させた際のN A D Hの減少で測定、比較した。

#### 【0051】

1 m lの活性測定液組成（50 mM トリエタノールアミン-HC l（p H 7. 5）、0. 5 mM D-2-デオキシリボース-5-リン酸、3. 9 U トリオースリン酸イソメラーゼ（S I G M A社製）、11 U グリセロール-3-リン酸脱水素酵素（S I G M A社製）、0. 12 mM N A D H、及び、測定対象の活性画分）のうち、D-2-デオキシリボース-5-リン酸、トリオースリン酸イソメラーゼ、グリセロール-3-リン酸脱水素酵素、N A D Hを除く組成を25℃で3分間インキュベートし、その後残りの組成を加え、分光光度計を用いて、25℃でのN A D Hの減少に伴う波長340 nmの吸収の減少を1分間測定した。酵素活性の1単位（U）は、25℃で1分間当たり1  $\mu$  m o lのN A D Hを減少させる酵素量と定義し、また、N A D Hの340 nmにおけるミリモル吸光係数は6. 22 m M<sup>-1</sup> c m<sup>-1</sup>とした。

サーモトーガ・マリティマ由来D E R A、パイロバキュラム・アエロフィラム由来D E R A、及び、大腸菌由来D E R Aの25℃での酵素活性（U）を表1に示す。

#### 【0052】

【表1】

酵素	酵素活性
サーモトーガ・マリティマ由来D E R A	0. 58 U
パイロバキュラム・アエロフィラム由来D E R A	0. 10 U
大腸菌由来D E R A	61. 1 U

##### 【実施例3】

#### 【0053】

##### 6-クロロ-2, 4, 6-トリデオキシヘキソースの合成

サーモトーガ・マリティマ由来D E R A 400  $\mu$  g（2. 42 U、50℃）を、100 mM クエン酸-クエン酸N a（p H 6. 5）、300 mM アセトアルデヒド（純正化学）、100 mM クロロアセトアルデヒド（東京化成製）の組成からなる反応液1 m lに添加し、25℃にて反応させた。同様に、パイロバキュラム・アエロフィラム由来D E R A 400  $\mu$  g（1. 57 U、50℃）を、100 mM 酢酸-酢酸N a（p H 5. 5）、300 mM アセトアルデヒド、100 mM クロロアセトアルデヒドの組成からなる反応液1 m lに添加し、25℃にて反応させた。大腸菌由来D E R A 400  $\mu$  g（23. 2 U、25℃）も、100 mM T r i s-HC l（p H 7. 5）を用いた他は、前述の超好熱性菌由来D E R Aの反応条件に従った。

##### 【実施例4】

#### 【0054】

##### 6-クロロ-2, 4, 6-トリデオキシヘキソースの定量

反応液をU L T R A F R E E-M Cフィルター（M i l l i p o r e社製）を用いた濾

過処理により除蛋白した後に、Shodex SUGAR SC1011 カラム（昭和電工製）にアプライし、80℃、水を用いて分析した。検出にはRI 検出器（日本分光製）を用いた。この溶出ピークエリア面積から、6-クロロ-2,4,6-トリデオキシヘキソースの合成量を定量し、その値を其々のDE RA間で比較した。

サーモトーガ・マリティマ由来DE RA、及び、パイロバキュラム・アエロフィラム由来DE RAは、大腸菌由来DE RAを上回る生産性を示した。結果を図1に示す。

6-クロロ-2,4,6-トリデオキシヘキソースの構造については、カラム分取品を<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR分析し、特許文献1での報告と合致することを確認した。

【産業上の利用可能性】

【0055】

超好熱性菌由来DE RAを用いることにより、従来の大腸菌由来DE RAを用いての方法と比較し、非天然基質を用いたアルドール縮合活性を著しく向上させることができ、さらに高い基質濃度でも反応性を維持することから、反応容器当りの生産性を向上させることができるため、キラルなヒドロキシアルデヒド化合物の工業的製造方法として好適である。

【図面の簡単な説明】

【0056】

【図1】 各種DE RAを用いた6-クロロ-2,4,6-トリデオキシヘキソース合成反応の転化率を比較した図である。図中、黒丸はサーモトーガ・マリティマ由来DE RAを、黒四角はパイロバキュラム・アエロフィラム由来DE RAを、黒三角は大腸菌由来DE RAをそれぞれ用いたことを示している。

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Mitsui Chemicals, Inc.

&lt;120&gt; A process for the preparation of a chiral compound of hydroxyl aldehyde

&lt;130&gt; P0002976

&lt;160&gt; 8

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 747

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Thermotoga maritima

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)... (744)

&lt;400&gt; 1

atg	ata	gag	tac	agg	att	gag	gag	gca	gta	gcg	aag	tac	aga	gag		45
Met	Ile	Glu	Tyr	Arg	Ile	Glu	Glu	Ala	Val	Ala	Lys	Tyr	Arg	Glu		
				5					10					15		

ttc	tac	gaa	ttc	aag	ccc	gtc	aga	gaa	agc	gca	ggc	att	gaa	gat		90
Phe	Tyr	Glu	Phe	Lys	Pro	Val	Arg	Glu	Ser	Ala	Gly	Ile	Glu	Asp		
				20					25					30		

gtg	aaa	agt	gct	ata	gag	cac	acg	aat	ctg	aaa	ccg	ttt	gcc	aca		135
Val	Lys	Ser	Ala	Ile	Glu	His	Thr	Asn	Leu	Lys	Pro	Phe	Ala	Thr		
				35					40					45		

cca	gac	gat	ata	aaa	aaa	ctc	tgt	ctt	gaa	gca	agg	gaa	aat	cgt		180
Pro	Asp	Asp	Ile	Lys	Lys	Leu	Cys	Leu	Glu	Ala	Arg	Glu	Asn	Arg		
				50					55					60		

ttc	cat	gga	gtc	tgt	gtg	aat	ccg	tgt	tat	gtg	aaa	ctg	gct	cgt		225
Phe	His	Gly	Val	Cys	Val	Asn	Pro	Cys	Tyr	Val	Lys	Leu	Ala	Arg		
				65					70					75		

gaa	gaa	ctc	gaa	gga	acc	gat	gtg	aaa	gtc	gtc	acc	gtt	gtt	ggt		270
Glu	Glu	Leu	Glu	Gly	Thr	Asp	Val	Lys	Val	Val	Thr	Val	Val	Gly		
				80					85					90		

ttt	cca	ctg	gga	gca	aac	gaa	act	cgg	acg	aaa	gcc	cat	gag	gca		315
Phe	Pro	Leu	Gly	Ala	Asn	Glu	Thr	Arg	Thr	Lys	Ala	His	Glu	Ala		
				95					100					105		

att	ttc	gct	gtt	gag	agt	gga	gcc	gat	gag	atc	gat	atg	gtc	atc		360
Ile	Phe	Ala	Val	Glu	Ser	Gly	Ala	Asp	Glu	Ile	Asp	Met	Val	Ile		
				110					115					120		

aac gtt ggc atg ctc aag gca aag gag tgg gag tac gtt tac gag	405
Asn Val Gly Met Leu Lys Ala Lys Glu Trp Glu Tyr Val Tyr Glu	
125 130 135	
gat ata aga agt gtt gtc gaa tcg gtg aaa gga aaa gtt gtg aag	450
Asp Ile Arg Ser Val Val Glu Ser Val Lys Gly Lys Val Val Lys	
140 145 150	
gtg atc atc gaa acg tgc tat ctg gat acg gaa gag aag ata gcg	495
Val Ile Ile Glu Thr Cys Tyr Leu Asp Thr Glu Glu Lys Ile Ala	
155 160 165	
gcg tgt gtc att tcc aaa ctt gct gga gct cat ttc gtg aag act	540
Ala Cys Val Ile Ser Lys Leu Ala Gly Ala His Phe Val Lys Thr	
170 175 180	
tcc acg gga ttt gga aca gga ggg gcg acc gca gaa gac gtt cat	585
Ser Thr Gly Phe Gly Thr Gly Gly Ala Thr Ala Glu Asp Val His	
185 190 195	
ctc atg aaa tgg atc gtg gga gat gag atg ggt gta aaa gct tcc	630
Leu Met Lys Trp Ile Val Gly Asp Glu Met Gly Val Lys Ala Ser	
200 205 210	
gga ggg atc aga acc ttc gag gac gct gtt aaa atg atc atg tac	675
Gly Gly Ile Arg Thr Phe Glu Asp Ala Val Lys Met Ile Met Tyr	
215 220 225	
ggt gct gat aga ata gga acg agt tcg gga gtt aag atc gtt cag	720
Gly Ala Asp Arg Ile Gly Thr Ser Ser Gly Val Lys Ile Val Gln	
230 235 240	
ggg gga gaa gag aga tat gga ggt tga	747
Gly Gly Glu Glu Arg Tyr Gly Gly	
245	

<210> 2

<211> 681

<212> DNA

<213> *Pyrobaculum aerophilum*

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (678)

<400> 2

atg ata cat tta gta gac tac gcg ctt ctc aag ccg tat ctc aca	45
Met Ile His Leu Val Asp Tyr Ala Leu Leu Lys Pro Tyr Leu Thr	
5 10 15	

gta gat gaa gca gtc gcc ggg gct cgc aag gcg gag gag ctg ggc	90
Val Asp Glu Ala Val Ala Gly Ala Arg Lys Ala Glu Glu Leu Gly	
20 25 30	
gtc gcg gcg tat tgc gta aat ccc ata tac gcc cct gtt gtt cgg	135
Val Ala Ala Tyr Cys Val Asn Pro Ile Tyr Ala Pro Val Val Arg	
35 40 45	
cct ttg ttg cgg aaa gta aag ctc tgc gta gtg gcg gac ttc ccc	180
Pro Leu Leu Arg Lys Val Lys Leu Cys Val Val Ala Asp Phe Pro	
50 55 60	
ttt ggg gcc ttg cca acg gcc agc aga att gcc ttg gtt tct agg	225
Phe Gly Ala Leu Pro Thr Ala Ser Arg Ile Ala Leu Val Ser Arg	
65 70 75	
ctt gct gaa gtg gca gat gag ata gac gtg gtg gcg cct ata ggc	270
Leu Ala Glu Val Ala Asp Glu Ile Asp Val Val Ala Pro Ile Gly	
80 85 90	
ctc gtg aaa tcg cgg agg tgg gcc gag gtg aga agg gac tta ata	315
Leu Val Lys Ser Arg Arg Trp Ala Glu Val Arg Arg Asp Leu Ile	
95 100 105	
agc gtt gtg ggt gcc gca ggc ggg aga gtg gta aag gta atc aca	360
Ser Val Val Gly Ala Ala Gly Gly Arg Val Val Lys Val Ile Thr	
110 115 120	
gag gag cct tat cta agg gat gag gag agg tat acg ctt tac gac	405
Glu Glu Pro Tyr Leu Arg Asp Glu Glu Arg Tyr Thr Leu Tyr Asp	
125 130 135	
att att gca gag gct ggg gcc cac ttt ata aaa agc tcc act gga	450
Ile Ile Ala Glu Ala Gly Ala His Phe Ile Lys Ser Ser Thr Gly	
140 145 150	
ttc gcc gaa gag gcc tac gcc gcc aga cag gga aat cct gta cac	495
Phe Ala Glu Glu Ala Tyr Ala Ala Arg Gln Gly Asn Pro Val His	
155 160 165	
tca acg ccg gag agg gcg gcg gca att gcc cgc tac ata aaa gag	540
Ser Thr Pro Glu Arg Ala Ala Ala Ile Ala Arg Tyr Ile Lys Glu	
170 175 180	
aag ggg tat aga ctg ggg gtg aaa atg gcg ggg ggg att agg aca	585
Lys Gly Tyr Arg Leu Gly Val Lys Met Ala Gly Gly Ile Arg Thr	
185 190 195	
agg gag cag gca aag gcc att gtt gac gcc att gga tgg ggc gag	630
Arg Glu Gln Ala Lys Ala Ile Val Asp Ala Ile Gly Trp Gly Glu	

200

205

210

gac cca gcc cgc gtc agg ctg ggg acg tcc acc cca gag gct ctt 675  
Asp Pro Ala Arg Val Arg Leu Gly Thr Ser Thr Pro Glu Ala Leu  
215 220 225

cta tag 681  
Leu

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;210&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer for PCR

&lt;400&gt; 3

tatatcatat gatagagtac aggattgagg 30

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer for PCR

&lt;400&gt; 4

taatggatcc tcaacctcca tatctctctt 30

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;210&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer for PCR

&lt;400&gt; 5

tatatcatat gatacattta gtagactacg 30

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer for PCR

&lt;400&gt; 6

taatggatcc ctatagaaga gcctctgagg 30

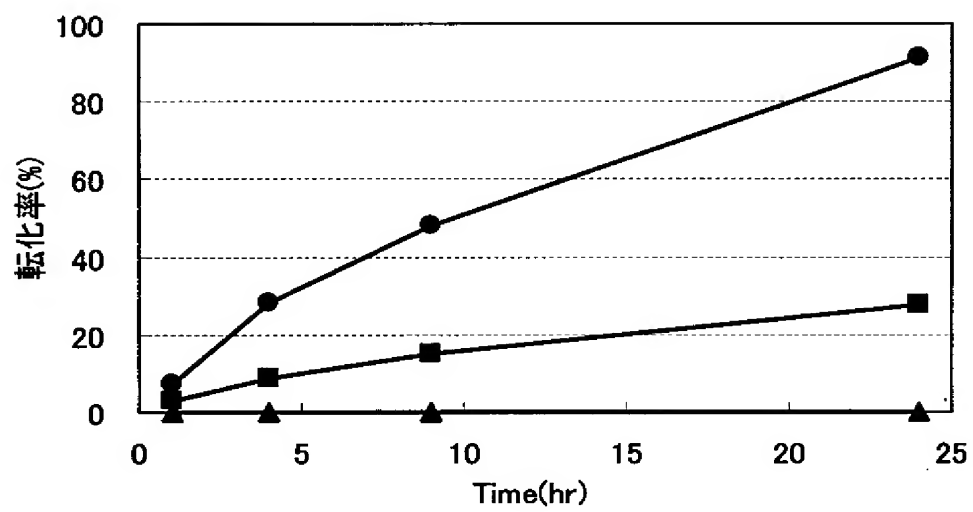
<210> 7  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Primer for PCR  
<400> 7  
tatactatat gactgatctg aaagcaagca 30

<210> 8  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Primer for PCR  
<400> 8  
taatggatcc ttagtagctg ctggcgctct 30



【書類名】 図面

【図 1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 従来のD-2-デオキシリボース-5-リン酸アルドラーゼを用いたアルドール縮合における、非天然基質に対する活性が低いという問題を解決し、非天然基質から3-ヒドロキシブチルアルデヒド誘導体、及び、D-2-デオキシリボース誘導体、及び、2, 4, 6-トリデオキシヘキソース誘導体を高効率で製造する工業的方法を提供する。

【解決手段】 超好熱性菌サーモトーガ・マリティマ由来D-2-デオキシリボース-5-リン酸アルドラーゼ、又は、超好熱性菌パイロバキュラム・アエロフィラム由来D-2-デオキシリボース-5-リン酸アルドラーゼを用いて、3-ヒドロキシブチルアルデヒド誘導体、及び、D-2-デオキシリボース誘導体、及び、2, 4, 6-トリデオキシヘキソース誘導体を合成する。

【選択図】 なし

## 出願人履歴

0 0 0 0 0 5 8 8 7

20031104

住所変更

東京都港区東新橋一丁目5番2号

三井化学株式会社